

**PATENT ABSTRACTS OF JAPAN**(11)Publication number : **10-245342**(43)Date of publication of application : **14.09.1998**

(51)Int.Cl.

**A61K 35/78****A61K 31/35****A61K 31/35****A61K 31/35****// C07D311/62**(21)Application number : **09-061761**(71)Applicant : **MITSUI NORIN KK**(22)Date of filing : **03.03.1997**(72)Inventor : **ARAYA KAZUO  
SETO HARUO****(54) AGENT FOR REDUCING NEURAL CELL TOXICITY OF BETA-AMYLOID PROTEIN**

(57)Abstract:

**PROBLEM TO BE SOLVED:** To obtain an agent for reducing the neural cell toxicity of  $\beta$ -amyloid protein by using polyphenols contained in tea, especially tea catechins/ theaflavins, having storing activities for reducing the neural cell toxicity of the  $\beta$ -amyloid protein.

**SOLUTION:** The tea polyphenols used herein comprise tea catechins and theaflavins, and are used singly or in combinations. The tea catechins and theaflavins comprise a least one kind of epicatechin gallate, epigallocatechin gallate, thioflavin monogallate, theaflavin monogallate B and theaflavin digallate, and are obtained by extracting tea leaves with hot water, methanol, etc., dissolving the obtained extract solution in an organic solvent, evaporating off the organic solvent, and subsequently subjecting the residue to a high performance liquid chromatography. The agent for reducing the neural cell toxicity of the  $\beta$ -amyloid protein may be used singly or suitable together with auxiliary components in response to purposes.

**LEGAL STATUS**

[Date of request for examination]

**17.12.2003**

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平10-245342

(43) 公開日 平成10年(1998) 9月14日

(51) Int.Cl.<sup>6</sup>

A 6 1 K 35/78

識別記号

31/35

AAA

AAM

AED

F I

A 6 1 K 35/78

31/35

C

X

AAA

AAM

AED

審査請求 未請求 請求項の数 4 F D (全 5 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号

特願平9-61761

(22) 出願日

平成9年(1997) 3月3日

(71) 出願人 591039137

三井農林株式会社

東京都中央区日本橋室町3丁目1番20号

(72) 発明者 新家 一男

東京都足立区足立1-5-7-703

(72) 発明者 瀬戸 治男

東京都八王子市上野町100-5

(74) 代理人 弁理士 久保田 藤郎 (外1名)

(54) 【発明の名称】  $\beta$ -アミロイド蛋白の神経細胞毒性低減剤

(57) 【要約】

【課題】 日常的に飲用されており、安全性に全く問題のない茶の成分の生理作用について検討し、神経細胞に対する $\beta$ -アミロイド蛋白の毒性を低減する作用を有する物質を開発すること。

【解決手段】 茶ポリフェノール類を有効成分として含有する $\beta$ -アミロイド蛋白の神経細胞毒性低減剤並びに $\beta$ -アミロイド蛋白の毒性により神経細胞を侵されている患者に対して、請求項1記載の低減剤の有効量を投与することを特徴とする $\beta$ -アミロイド蛋白の神経細胞毒性を低減する方法。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 茶ポリフェノール類を有効成分として含有する $\beta$ -アミロイド蛋白の神経細胞毒性低減剤。

【請求項2】 茶ポリフェノール類が茶カテキン類及び／又はテアフラビン類である請求項1記載の神経細胞毒性低減剤。

【請求項3】 茶カテキン類及び／又はテアフラビン類がエピカテキンガレート、エピガロカテキンガレート、テアフラビン、テアフラビンモノガレートA、テアフラビンモノガレートB及びテアフラビンジガレートのうちの少なくとも1種である請求項2記載の神経細胞毒性低減剤。

【請求項4】  $\beta$ -アミロイド蛋白の毒性により神経細胞を侵されている患者に対して、請求項1記載の低減剤の有効量を投与することを特徴とする $\beta$ -アミロイド蛋白の神経細胞毒性を低減する方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、 $\beta$ -アミロイド蛋白の神経細胞毒性低減剤及びその使用方法に関し、詳しくは茶ポリフェノール類を有効成分として含有する $\beta$ -アミロイド蛋白の神経細胞毒性低減剤並びに $\beta$ -アミロイド蛋白の毒性により神経細胞を侵されている患者に対して、該低減剤を投与して $\beta$ -アミロイド蛋白の神経細胞毒性を低減する方法に関する。

## 【0002】

【従来の技術】近年高齢化社会を迎え、痴呆は社会的な問題となっている。その中でも、25%程度を占めるアルツハイマー型痴呆や、これよりさらに低年齢で発症するアルツハイマー病は、脳血管性痴呆と並んで老齢期痴呆の中核とも言える重要な疾患である。これらの痴呆は進行性で、治療することは極めて困難であると考えられている。アルツハイマー型痴呆及びアルツハイマー病は、形態学的には大脳皮質や海馬に萎縮や脱落が認められる変性疾患で、その顕著な病理所見として(1)大脳皮質や海馬に存在する老人斑と $\beta$ -アミロイド蛋白の沈着及び(2)神経原線維の変化が挙げられる。

【0003】アルツハイマー病の発症機構としては、沈着した $\beta$ -アミロイド蛋白の神経細胞毒性に起因するという説が最も支持されている。この $\beta$ -アミロイド蛋白は、アミロイド前駆体蛋白質の一部で、細胞膜貫通ドメインと細胞外ドメインとにまたがるようにして存在し、神経細胞に対して毒性を示すことが知られている。そのため、神経細胞に対する $\beta$ -アミロイド蛋白の毒性を低減する化合物の検索が行われており、これまでにビタミンE (C. Behl, J. B. Davis, R. Lesley and D. Schubert, Cell, 77, 817-827 (1994))や生薬ガラナの成分である(+)-カテキン(国上他、1996年度日本農芸化学会講演要旨集、p53 (1996))に毒性を低減させる効果があることが明らかになっている。

【0004】一方、茶に大量に含まれているポリフェノール類、特に茶カテキン類やテアフラビン類についても、その生理作用に関する研究がなされ、コレステロールの上昇抑制作用(特公平2-44449号公報)や $\alpha$ -アミラーゼ阻害作用(特公平3-133928号公報)などを有していることが報告されている。しかし、茶ポリフェノール類が神経細胞に対する $\beta$ -アミロイド蛋白の毒性を低減させる作用を有しているという報告は未だない。

## 【0005】

【発明が解決しようとする課題】本発明の目的は、日常的に飲用されており、安全性に全く問題のない茶の成分の生理作用について検討し、神経細胞に対する $\beta$ -アミロイド蛋白の毒性を低減する作用を有する物質を開発することである。そこで本発明者らは、茶に含まれているポリフェノール類について、 $\beta$ -アミロイド蛋白のもたらす神経細胞毒性を低減する作用の有無を検討したところ、これらが強い $\beta$ -アミロイド蛋白の神経細胞毒性低減活性を有していることを見出し、本発明を完成するに至った。

## 【0006】

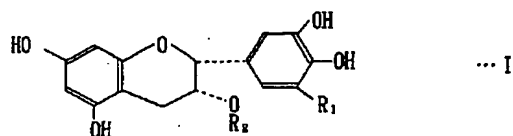
【課題を解決するための手段】請求項1記載の本発明は、茶ポリフェノール類を有効成分として含有する $\beta$ -アミロイド蛋白の神経細胞毒性低減剤である。請求項2記載の本発明は、茶ポリフェノール類が茶カテキン類及び／又はテアフラビン類である請求項1記載の神経細胞毒性低減剤である。請求項3記載の本発明は、 $\beta$ -アミロイド蛋白の毒性により神経細胞を侵されている患者に対して、請求項1記載の低減剤の有効量を投与することを特徴とする $\beta$ -アミロイド蛋白の神経細胞毒性を低減する方法である。

## 【0007】

【発明の実施の形態】本発明に用いる茶ポリフェノール類は、下記の一般式Iで表される茶カテキン類と一般式IIで表されるテアフラビン類であり、これらを単独で、もしくは組み合わせて用いることができる。

## 【0008】

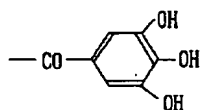
## 【化1】



【0009】(式中、 $R_1$  はHまたはOHを示し、 $R_2$  はHまたは

## 【0010】

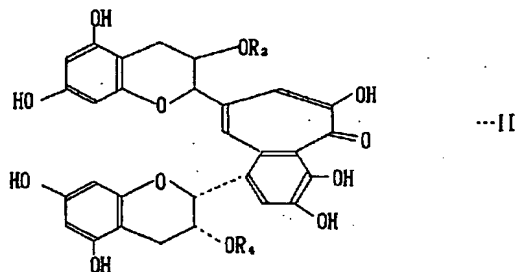
## 【化2】



【0011】を示す。）

【0012】

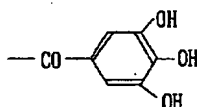
【化3】



【0013】(式中、 $R_3$  及び  $R_4$  はHまたは

【0014】

【化4】



【0015】を示し、 $R_3$  及び  $R_4$  は同じであっても異なっているもよい。）

【0016】上記の一般式Iで表される茶カテキン類の具体例としては以下のものを挙げることができる。

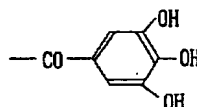
エピカテキン(EC)(一般式I中、 $R_1 = H$ ,  $R_2 = H$ のもの)

エピガロカテキン(EGC)(一般式I中、 $R_1 = OH$ ,  $R_2 = H$ のもの)

エピカテキンガレート(ECg)(一般式I中、 $R_1 = H$ ,  $R_2 =$

【0017】

【化5】



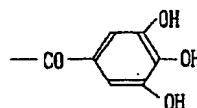
のもの)

【0018】エピガロカテキンガレート(EGCg)

(一般式I中、 $R_1 = OH$ ,  $R_2 =$

【0019】

【化6】



のもの)

【0020】次に、上記の一般式IIで表されるテアフラ

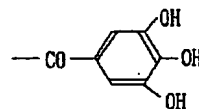
ビン類を具体的に示すと、以下のものがある。

遊離型テアフラビン(TF1)(一般式II中、 $R_3 = H$ ,  $R_4 = H$ のもの)

テアフラビンモノガレートA(TF2A)(一般式II中、 $R_3 =$

【0021】

【化7】

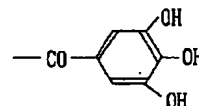


【0022】、 $R_4 = H$ のもの)

テアフラビンモノガレートB(TF2B)(一般式II中、 $R_3 = H$ ,  $R_4 =$

【0023】

【化8】

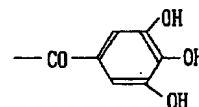


のもの)

【0024】テアフラビンジガレート(TF3)(一般式II中、 $R_3$ ,  $R_4 =$

【0025】

【化9】



のもの)

【0026】なお、上記茶ポリフェノール類には一般式I, IIで表される化合物と同一の平面構造で表すことのできる構造異性体も包含され、特に一般式Iで表される茶カテキン類のうちECを除く化合物の2位及び3位の配置がシス体又はトランス体のものや一般式IIで表されるテアフラビン類の2位、3位、2'位及び3'位の配置がシス体又はトランス体のものはすべて本発明に用いられる。本発明の神経細胞毒性低減剤の有効成分である茶ポリフェノール類の活性については、EC及びEGCが最も強い活性を示す濃度は、(+)-カテキンと同じく50 $\mu$ Mである。しかし、ECgとEGCgはその1/5の濃度で、またTF1, TF2A, TF2B及びTF3は2/5の濃度で最も強い活性を示し、それぞれ(+)-カテキンよりも5倍又は2.5倍高い活性を有している。

【0027】上記茶ポリフェノール類はEGCgやECgを主成分として含み、茶葉を原料として製造することができる。その製法は特開昭59-219384号公報、同60-13780号公報、同61-130285号公報などに記載されている。例えば、茶葉を熱湯、メ

タノールもしくはエタノール水溶液及びアセトン水溶液から選ばれた溶剤で抽出し、得られた抽出液を有機溶媒に転溶した後、有機溶媒を留去する方法がある。さらに、このようにして得られた抽出成分濃縮液を高速液体クロマトグラフィーにて上記各物質に分離することができる。茶葉としては各種形態のものを使用でき、例えば茶生葉、不発酵茶、半発酵茶、煎茶、インスタント緑茶などがあり、茶殻でもよい。なお、茶カテキン類は通常、茶葉に10%程度含まれており、テアフラビン類は紅茶に含まれ、紅茶のオレンジ色を決定づけている物質である。

【0028】本発明の $\beta$ -アミロイド蛋白の神経細胞毒性低減剤は、単独で使用する他、目的に応じて常用される補助的成分を適宜配合することができる。すなわち、適当な賦形剤、例えばゼラチン、アルギン酸ナトリウムなどと混合したり、水、アルコール類などの溶媒、カルボキシメチルセルロースなどの希釈剤等と組合わせて用いられる。本発明の $\beta$ -アミロイド蛋白の神経細胞毒性低減剤の経口及び非経口のいずれの形態でも投与することができる。例えば、経口投与する場合、飲料、食品をはじめとする各種飲食物や酒類などの嗜好品；うがい薬、歯磨き、トローチ、口中香錠等の口腔衛生品；内服液、散剤、粒剤、錠剤、カプセル等の医薬品；医薬部外品などの形態がある。また、非経口で投与する場合は、注射剤、点滴剤等の液剤の他、固形状や懸濁粘稠液状として座薬としても使用することができる。非経口での投与方法としては、局所組織内投与、注射剤として皮下、皮内、筋肉内、静脈注射などの他、局所への挿入、塗布、噴霧などの外用的投与も可能である。また、本発明の神経細胞毒性低減剤は、餌料、飼料などとして家畜、ペット類などに用いることもできる。

【0029】本発明の $\beta$ -アミロイド蛋白の神経細胞毒性低減剤の投与量については、その使用目的に応じて適宜決定すればよいが、有効成分の安全性が高いので、多量を継続的に投与しても副作用の心配はない。

【0030】

【実施例】次に、本発明を実施例により詳しく説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

#### 実施例1

妊娠18日齢ラット胎児の脳より調製した海馬神経細胞を、細胞濃度が $6 \times 10^4$  cell/cm<sup>2</sup>となるように96穴プレートに播種した。なお、培地としてDMEM培地（日水製薬株式会社製）にグルコースを0.5%添加したものにGMS-A supplement（GIBCO社製）を培地1リットル当たり1本添加した無血清培地を用いた。培養開始から8～10時間は、透析したFCS（牛胎児血清）（JRH BIOSCIENCE社製）を10%の濃度になるように添加し、その後は無血清培地に変えて37℃にて5日間培養した。

【0031】培養開始から5日後に培地を、茶ポリフェノール類（茶カテキン類又はテアフラビン類）の所定量を含んだ無血清培地に交換すると共に、終濃度が10 $\mu$ Mとなるように $\beta$ -アミロイド蛋白（BACHEM社製）を添加した。また、対照として $\beta$ -アミロイド蛋白のみを添加した無血清培地を用いた。これらの培地で37℃にて24～30時間培養後、MTT法（テトラゾリウム塩を用いた毒性試験法）〔動物実験代替法マニュアル、p.51-61、共立出版(1994)〕を用いて、海馬神経細胞の生存率を測定した。測定値は、 $\beta$ -アミロイド無添加の培地に培養した海馬神経細胞の生存数を100としたときの試験区及び対照区の生細胞数で表した。結果を第1表に示す。表中、A $\beta$ (-)は $\beta$ -アミロイド蛋白無添加区、A $\beta$ (+)は $\beta$ -アミロイド蛋白のみを添加した対照区、ECはエピカテキンの所定量を添加した試験区、EGCはエピガロカテキンの所定量を添加した試験区、EGCgはエピカテキンガレートの所定量を添加した試験区、EGCgはエピガロカテキンガレートの所定量を添加した試験区、TF1は遊離型テアフラビンの所定量を添加した試験区、TF2AはテアフラビンモノガレートAの所定量を添加した試験区、TF2BはテアフラビンモノガレートBの所定量を添加した試験区、TF3はテアフラビンジガレートの所定量を添加した試験区、(+)-Cは $\beta$ -アミロイド蛋白と50 $\mu$ Mの(+)-カテキンを添加した対照区をそれぞれ示す。

【0032】

【表1】

第1表 海馬細胞の生存率

試料名	試料の添加量 ( $\mu$ M)						(+) - C	A $\beta$ (+)	A $\beta$ (-)
	50	25	20	10	5	1			
EC	118.6						96.0	37.8	100
EGC	107.2	72.8			59.5	53.6	81.0	45.7	100
ECg				96.7			96.0	37.8	100
EGCg			108.2	110.7	77.0	56.5	81.0	45.7	100
TF1			98.1	59.7			88.8	50.9	100
TF2A			109.9	68.3			88.8	50.9	100
TF2B			108.2	63.2			88.8	50.9	100
TF3			118.8	69.0			88.8	50.9	100

【0033】表から明らかなように、茶カテキン類の場合は、EC又はEGCを50 $\mu$ M添加したとき、100%の海馬神経細胞が生存しており、茶カテキン類の主成分であるECg及びEGCgは10 $\mu$ Mの添加で100%の海馬神経細胞が生存していた。このことから、ガレート型のカテキン類の方が活性が強いことが分かる。一方、テアフラビン類の場合は、TF1がやや活性が弱い、いずれのテアフラビン類も20 $\mu$ Mの添加で100%の細胞が生存していた。このように、茶ポリフェノール類は比較的少量の添加によって、 $\beta$ -アミロイド蛋白による神経細胞毒性を低減ないし抑制することができ

る。

【0034】

【発明の効果】本発明の $\beta$ -アミロイド蛋白の神経細胞毒性低減剤は、 $\beta$ -アミロイド蛋白の沈着を伴う神経細胞毒性を顕著に軽減させる作用がある。しかも、これは茶に含まれる天然物であるポリフェノール類を有効成分とするものであるから、安全性が高い上に、経口摂取により体内に取り込ませることができる。そのため、薬剤としての投与だけでなく、日常の飲食物等に添加して利用することもできる。

フロントページの続き

(51)Int. Cl.<sup>6</sup>  
// C07D 311/62

識別記号

FI  
C07D 311/62